

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-105003

⑬ Int. Cl. 1

C 08 B 37/08
 A 61 K 7/00
 9/48
 9/62
 9/70
 47/00
 A 61 L 15/01
 27/00

識別記号

3 3 6

序内整理番号
 6779-4C
 7306-4C
 E-6742-4C
 A-6742-4C
 A-6742-4C
 J-6742-4C
 C-6742-4C
 6779-4C
 D-6779-4C

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月10日

審査請求 未請求 発明の数 11 (全36頁)

⑮ 発明の名称 ヒアルロン酸の架橋エステル

⑯ 特願 昭62-258165

⑰ 出願 昭62(1987)10月13日

優先権主張 ⑯ 1986年10月13日 ⑯ イタリア(I T) ⑯ 48546 A/86

⑯ 発明者 フランセスコ・デラ・イタリア国パドヴァ、ヴィア・セラート14番
ヴィツレ

⑯ 発明者 アウレリオ・ロメオ イタリア国ローマ、ヴィアレ・イツボクラーテ83番

⑯ 出願人 フィ黛イア・ソシエ イタリア国35031アバーノ・テルメ、ヴィア・ポンテ・デ
タ・ペル・アチオニ ラ・ファツブリカ3/ア番

⑯ 代理人 弁理士 青山 蔦 外1名

明細書

1. 発明の名称

ヒアルロン酸の架橋エステル

2. 特許請求の範囲

1. ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、並びに、そのような部分的な架橋エステルの無限または有限基の塩(ただし、脂肪酸エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない)。

2. 脂肪族多価アルコールが二価アルコールである第1項記載の架橋エステル。

3. 脂肪族多価アルコールが2-16個の炭素原子を有する第1項記載の架橋エステル。

4. 该二価アルコールがエチレンギリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコールおよびベンタン、ヘキサン、ヘプタンおよびオクタンから導かれるグリコール、並びにそれらの位置異性体からなる群から選択される第2項記載の架橋エステル。

5. 脂肪族多価アルコールが、グリセリン、エリスライトおよびベンケエリスライトからなる群から選択される第1項記載の架橋エステル。

6. 该ヒアルロン酸の架橋結合していないカルボキシ基の少なくとも一個が、炭素原子数3-4個までの脂肪族アルコールであって、アミノ、ヒドロキシ、メルカプト、アルデヒド、ケト、カルボキシ、ヒドロカルビルおよびジヒドロカルビルアミノ基、エーテル、エステル、チオエーテル、チオエステル、アセタール、ケタール、カルバーコキシ、カルバミド基および1または2個のアルキル基によって置換されている置換カルバミド基、これら置換的に修飾された基のヒドロカルビル残基の炭素原子数は最高6個である、によって置換されていることもあり、その脂肪族アルコールの炭素原子数が、酸素、硫黄および窒素からなる群から選択される異種原子によって中断されていることもある脂肪族アルコールによってエステル化されている第1項-第5項のいずれかに記載の架橋エステル。

7. 族脂肪族アルコールがエチルアルコール、プロピルアルコール、イソブロピルアルコール、n-オブチルアルコール、イソブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、アミルアルコール、ベンチルアルコール、ヘキシルアルコール、またはオクチルアルコールである第6項記載の架構エステル。

8. 族ヒアルロン酸の架構結合していないカルボキシ基の少なくとも一個が唯一個のベンゼン環基を有する芳香性脂肪族アルコールであって、その脂肪鎖の炭素原子数は最高6個であり、ベンゼン環基は1-3個のメチルまたはヒドロキシ基、又はハログン原子で置換されていることもあり、脂肪鎖は、遊離の、またはモノ-メチルアミノ基、ジーエチルアミノ基、ビロリジン基およびビペリジン基からなる群から選択される！またはそれ以上の機能的な基で置換されていることもある、芳香性脂肪族アルコールによってエステル化されている第1項-第5項のいずれかに記載の架構エステル。

なくとも一個がコーテゾン、ヒドロコーテゾン、ブレドニゾン、ブレドニゾロン、フルオロコーテゾン、デキサメザゾン、ベータメザゾン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、バラメサゾン、フルメサゾン、フルシノロンおよびそのアセトニド、フルブレドニリデン、クロベタゾルおよびベクロメサゾンからなる群から選択されるアルコールによってエステル化されている第9項記載の架構エステル。

11. 脂肪族エステルと、アルカリまたはアルカリ土類金属、マグネシウムまたはアルミニウムとの塩である第1項-第10項のいずれかに記載の部分的エステルの塩。

12. ナトリウムまたはアンモニウム塩である第11項記載の架構エステルの塩。

13. アンモニウム、芳香性脂肪族、環状脂肪族または複素環基から導かれる、第1項-第10項のいずれかに記載の部分的エステル。

14. 第1項-第13項のいずれかに記載の架構エステルと薬学的に許容し得る粗体、試形剤または

9. 族ヒアルロン酸の架構結合していないカルボキシ基の少なくとも一個が、炭素原子数3-4個までの單環または多環式炭水化物から導かれる環状脂肪族アルコールまたは脂肪族一環状脂肪族アルコールであって、アミノ、ヒドロキシ、メルカプト、アルデヒド、ケト、カルボキシ、ヒドロカルビルアミノおよびヒドロカルビルアミノ基、エーテル、エステル、チオエーテル、チオエステル、アセタール、ケタール、カルバルコキシ、カルバミド基および！またはそれ以上のアルキル基によって置換されている置換カルバミド基、これらの機能的に修飾された基のヒドロカルビル基の炭素原子数は最高6個である、によって置換されていることもあり、更に、炭素原子鎖が複素、既質および複質からなる群から選択される異種原子によって中断されていることもあります、また、！またはそれ以上の芳香性結合を有していることもあるアルコールによってエステル化されている第1項-第5項のいずれかに記載の架構エステル。

10. 脂肪族結合していないカルボキシ基の少

たは希釈剤とを含有する医薬組成物。

15. 第1項-第13項のいずれかに記載の架構エステルをビヒクルとし、薬学的に活性な物質と混合してなる医薬組成物。

16. 第8項-第13項のいずれかに記載の架構エステルを含有する医薬組成物であって、該架構結合していないカルボキシ基でエステル化されたアルコールが、薬学的に活性なアルコールである医薬組成物。

17. 第1項-第13項のいずれかに記載の架構エスルまたはその塩を活性成分とする化粧品。

18. 第1項-第13項のいずれかに記載の架構エスルまたはその塩を化粧品用ビヒクルとして含有する化粧品。

19. 第1項-第13項のいずれかに記載の架構エスルまたはその塩を含有する衛生、医療または外科用製品。

20. 治療上不活性なアルコールから導かれる架構エスルのフィルムを含有する第19項記載の衛生、医療または外科用製品。

21. 治療上不適性なアルコールから導かれる

架橋エステルの系を含有する第1項記載の衛生、
医療または外用製品。

22. 第1項-第13項のいずれかに記載の架
橋エステルまたはその塗を含有する薬用のカプ
セルまたはマイクロカプセル。

23. 第1項-第13項のいずれかに記載の架
橋エステルまたはその塗を人工の皮膚として皮膚
科学において用いるためのフィルムの製造に使用
する方法。

24. 第1項-第13項のいずれかに記載の架
橋エステルまたはその塗を外科手術に用いるため
に、縫合糸の製造に使用する方法。

25. 中性滑紙中でヒアルロン酸のカリウム、
ナトリウムまたは4級アンモニウム塩とエーテル
化剤とを反応させることからなる完全または部分
的なヒアルロン酸の架橋エステルの製造方法。

26. ヒアルロン酸の塩がナトリウムまたは
カリウム塩であり、反応を触媒とする4級アンモニ
ウム塩の存在下で行うことからなる第25項記載

32. 族ヒアルロン酸またはヒアルロン酸の族
部分的架橋エステルの架橋結合でないカルボ
キシ基を脂肪族、芳香族脂肪族または環状脂肪族
アルコールでエステル化する第25項-第31項
のいずれかに記載の方法。

33. 架橋結合していないカルボキシ基でエ
ステル化されたアルコールが薬理学的に活性なア
ルコールである第32項記載の方法。

34. 少なくとも一價の遊離のカルボキシ基を
有する族部分的架橋エステルがアルカリ金属または
アルカリ土類金属、マグネシウムまたはアンモニ
ウムで強化されている第25項-第33項のい
ずれかに記載の方法。

35. 族ヒアルロン酸が平均分子量50,00
0-730,000の範囲であり、実質上、平均
分子量30,000以下ヒアルロン酸を含有し
ないものである第25項-第34項のいずれかに
記載の方法。

36. ヒアルロン酸範囲の平均分子量が50,
000-100,000, 250,000-350,

の方法。

27. 族4級アンモニウム塩がヨウ化テトラ
ブチルアンモニウムである第26項記載の方法。

28. 族中性滑紙がジアルリスルホキシド、
ジアルキルカルボキシルアミド、低級脂肪族の低
級アルキルのジアルキルアミドである第25項-
第27項のいずれかに記載の方法。

29. 族多価アルコールが脂肪族多価アルコー
ルであり、族エーテル化剤が脂肪族多価アルコー
ルのアルキルハゲン化物である第25項-第2
8項のいずれかに記載の方法。

30. 脂肪族多価アルコールが二価アルコー
ルである第29項記載の方法。

31. 脂肪族多価アルコールがエチレングリ
コール、プロピレングリコール、ブチレングリゴ
ール、およびベンタノン、ヘキサン、ヘプタンおよ
びオクタンから導かれるグリコール類およびそれ
らの位置異性体、グリセリン、エリスリートおよ
びベンタエリスリートからなる群から選択される
ものである第29項記載の方法。

000、または500,000-730,000で
ある第35項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

発明の背景および産業上の利用分野

本発明は、ヒアルロン酸多価類の2またはそれ
以上のカルボキシ基で多価アルコールをエステル
化することにより得られた、ヒアルロン酸の多価
アルコールエステルに関するものであって、この
エステルは、同一または別個のヒアルロン酸分子
のカルボキシ基間に架橋結合が存在することによ
り「架橋エステル」と記述され得る。これらの架橋
エステルは、完全、または部分的であり、後者の
場合には架橋結合を形成することなく一価または
多価アルコールによってさらにカルボキシ基がエ
ステル化され得る(以後、このエステルを「単エス
テル」と記載する)。いずれのタイプの部分的架橋
エステルにおいても、エステル化されていないカル
ボキシ基は遊離の状態、あるいは金属または有
機塩基の塩のいわゆってもよい。

また本発明は医薬および化粧品の分野において、

衛生および外科用製品を製造するために、新規なヒアルロン酸の架橋エステルを生物分解性のプラスチック材料の分野に利用することに関するものであり、従って、本発明はそのような分野で同物質から製造される様々な製品を包含するものである。この新規なエステルの具体的な用途は、架橋エステル化の程度、即ち上記の多価アルコールによってエステル化されたカルボキシ基の架橋結合した基の数、単エステル化された基の数、並びに収率的には、塩化された基の数と関連して考査されるものであり、エステル化または縮合の程度はそれ自身、生成物の溶解度および生成物の粘弾性に関連している。例えば、完全な架橋エステルは実質上、水性液体に不溶性であり、その分子の構造から、プラスチック材料または合成樹脂の製造に用いる上で、又、それらの物質の低加熱として確めて適している。平均的またはそれ以下のエステル化率のエステル、並びにその無機または有機塩による塩は多少なりとも水性条件下で可溶性であり、化粧品および医薬の両者、並びに一

ヘキサン、並びにビスフェノールAおよびビスフェノールFのグリジルエステルが挙げられている。この特許出願に用いられている製造方法は、特許請求の範囲において、ハロメチオキシランまたはビニルエポキシ化合物の使用に限定されており、又、可能な応用例は低エステル化率のヒアルロン酸の架橋エステルを得ることに限定されている。実際、この特許出願の実施例によると、エピクロロヒドリンを反応させた場合(実施例4)、最高4%のエステル化率が達成され、低溶解性の生成物が得られている。

本発明はエステル基が水酸基で置換されていない基を含んでいたり特殊なエステル類(上記エポキシドとヒアルロン酸またはその塩との反応生成物の場合)をも含めて、広範囲におよぶ架橋エステルの組み合わせを提供するものである。重要な点として、本発明は、交差結合したエステル基と交差結合していない幾つかのエステル基とを含有するエステル基の混合物であって、交差結合している基の割合がヒアルロン酸の二糖類単位全体の】

一般的な医療・衛生分野で有用なゲルの製造に適している。

ヨーロッパ特許出願第0161887(1985年5月3日、1985年11月21日公開)には、「多官能性」と記されたエポキシ化合物との反応によって得られたヒアルロン酸の架橋誘導体がいくつか記載されている。上記特許公開において、「多官能エポキシ化合物」なる語句は、少なくとも一個のエポキシ官能基を有し、更に、エポキシ官能基内に転換可能な官能基を有し、エポキシ基を介して架橋反応が起こり得る炭化水素を意味している。この特許においては、そのような官能基の内、ハロゲンのみが言及されている。上記特許明細書中には、このような多官能性エポキシ化合物の内、数例しか挙げられていない。即ち、エピクロロヒドリン、エピブロモヒドリン、メチルエピクロロヒドリン、メチルエピブロモヒドリン、1,2-ビス(2,3-エポキシプロポキシ)-エタン、1,4-ビス(2,3-エポキシプロポキシ)-ブタ、1,6-ビス((2,3-エポキシプロポキシ)

0%以上である、混合エステルを提供するものである。

英國特許出願第2151244A(1984年8月13日、1985年7月17日公開)および米国特許出願第434082A(1984年9月17日、1985年7月11日公開)には、ホルムアルデヒド、ジメチロールクレア、ジメチロールエチレンウレア、ポリアジリジン、ポリイソシアネート、及びビニルスルホンヒアルロン酸に作用させて得られるヒアルロン酸の架橋誘導体が幾つか記載されている。そのような誘導体は不溶性であり、その生物適合性の故に、生体内で用いる心臓弁、または血管クリップ等の様々な補助物質として、あるいはそれら製品の製造に用いられる様々な高分子材料に添加して用いることが提唱されている。同じ特許中には、「架橋」を達成するための試薬としてエチルオキシドを用いることが提案されているが、その方法は示されおらず、又、得られた生成物のタイプも明らかにされていない。他の架橋誘導体の構造は明記さ

れていず、又、架橋を形成している結合のタイプについての記載もない。ホルムアルデヒドおよび上記の置換尿素の場合、セミアセチール構造を有するヒアルロン酸のカルボキシ基が開きした游離体であり、他の場合は、水酸基のアルキル化産物であることを意味するといえる。

従って、本発明の主たる目的は、ヒアルロン酸と脂肪族系多価アルコールとの完全、または部分的な架橋エステルにあると明言する。部分的な架橋エステルにおいては、カルボキシ基は脂肪族系、脂環系、芳香性脂肪族系、または複素環系の一価または多価アルコールによってエステル化されていてよく、部分のエステル中には、エステル化されていない、無機または有機酸基によって塩化されたカルボキシ基が存在しててよい、ただし、ヒアルロン酸へのハロメチルオキシランまたはビスエボキシ化合物の作用によって生成される架橋エステルは缺く。

発明の詳しい記載

「ヒアルロン酸」という語句は文献中ではD-グ

ン酸の分子量は約8-13×10⁴である。しかしながら、この多種類の分子量は例えば後述の手段、放射線照射の影響下、あるいは加水分解、酸化または酵素剤等の様々な物理学的および化学的因素による手段によって容易に分解される。この理由によって、原抽出物に通常の精製法を適用しても、分解された分子量の小さい部分(フラクション)が得られる(パラズら、前出)。

ヒアルロン酸、その分子画分、およびその塩は医薬として用いられており、それらを化粧品として用いることが提唱されている(上記、パルツラの記事、並びに特許第2478468号参照)。治療薬として、ヒアルロン酸およびその塩は特に、関節炎、例えば獣医学分野で馬の関節炎の治療に用いられてきた[アクタ・ペタ・スカン(Acta Vet. Scand.) 167, 379(1976)]。天然の器官および組織の補助および代用物質として、ヒアルロン酸、その分子画分、およびその塩は眼科学の分野で用いられてきた[バルツ等、「眼科学における近年の問題(Modern Problems i

ルクロン酸とN-アセチル-D-グルコサミン酸残基からなる、天然に存在している様々な分子量の酸性多糖類に用いられており、それは細胞表面、脊椎動物の結合組織の基底性細胞外物質、関節の滑液、眼球内液、ヒトさい帯および鳥のときか等に存在している。ヒアルロン酸は生物において、皮膚、骨、筋肉および軟骨のごとき多くの組織細胞の機械的な支持体として重要な役割を担っており、従って、細胞内マトリックスの主成分であるが、それはまた、組織の保湿、潤滑化、および細胞の運動、細胞機能、および細胞の分化等の他の生物学的プロセスにも重要な役割を担っている(例、パラズら(A. Balazs)[Cosmeticks and Toiletries]イタリアンエディションNo.5/84, p. 8-17)。

ヒアルロン酸は、上記の天然組織、例えば鳥のときか、あるいはある種の細胞からも抽出し得る。今日では、ヒアルロン酸は、微生物学的手法によつても得られる。抽出によって得られる全ヒアルロ

n(Ophthalmology)110, 1970, p.3、ストリエフ(E. B. Strieff)、カーチー(S. Kaucher) 著、バーセル(Basel)、または「ビスコサージャリーおよび小室内レンズ移植術中におけるヒアルロン酸ナトリウムの使用(Viscosurgery and the Use of Sodium Hyaluronate During Intraocular Lens Implantation)」、眼内移植に関する国際会議及び第1回フィルムフェスティバル(カンヌ、1979)における論文、およびHYの眼科学における使用に関する文献の要約を含んだ米国特許第4,328,803、並びに米国特許第4,147,973参照]。EP公開第0138572A3(1985年4月24日)には例えばヒアルロン酸分子画分のナトリウム塩を眼内、および関節結合部に、それぞれ、眼内の眼内液の代わりとして、又、関節炎の治療のために用いるのに適していることが記載されている。

又、ヒアルロン酸は、ポリウレタン、ポリエステル、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシリキ

サン、ビニルおよびアクリルポリマー、及びカーボンファイバー等の衛生及び外科用製品に用いられる種々の高分子材料の添加剤として用いると、これら材料の生物への適合作用を現すことができる。この場合、HYまたはその塗の添加は、例えば、そのような材料の表面を被覆する、またはそのような材料中に拡散させる等によって、有効に行える。そのような材料は様々な衛生及び医療製品、例えば心臓弁、眼内レンズ、血管クリップ、ペースメーカー、および同様の製品の製造に用いられる(米国特許第4,500,676参照)。

「ヒアルロン酸」という語句は通常、実際上、これまでに見られるように、D-グルクロン酸及びN-アセチル-D-グルコサミン酸基が変化した、分子量の異なる一連の多糖類の全て、あるいはその分解された部分にも不正確に用いられている、「ヒアルロン酸類」と、複数形で用いるほうがより正確である。しかしながら、本明細書では分子部分の場合も同様に、すべて同じこの語句で表すこととし、更に、「HY」なる省略形をも頻

当初の有機酸類とは混ざり合うが、HYエステルはそれに溶けることのない他の有機酸類でその有機酸類を抽出する。これらの利点は本発明の架橋化合物においてより多く認めることができた。

本発明の架橋エステルは脂肪族系の多価アルコールから得られるが、これらの醇類は最高8個のアルコール官能基を有し、特にそのような官能基を4個有する炭素原子数16までの多価アルコールから導かれるものが好ましい。「多価」という語句は、厳密にいえば、一般に3またはそれ以上の水酸基を有するアルコールを指し「二価」、または「グリセロール」という語句は一般に2個の水酸基を有するアルコールを指す。しかしながら、本明細書では「多価」という語句を2またはそれ以上の水酸基を有するアルコールを包含するものとして用いる。従って、「多価」アルコールという語句は二価アルコール、三価アルコール、四価アルコール、五価アルコール、および六価アルコールを意味しうる。これらの内、グリセリン、3種のエリストライ性体、ベンタエリストライ、4種の

類にも用いる。

脂肪族アルコール、芳香性脂肪族アルコール、環状脂肪族アルコールあるいは複素環式アルコールのエステルの特性は酸性多糖類自身の特性と同様か、またはそれより優れており、それらは上記の用途に一層適していると言える。そのようなエステル類、及びその製造方法は同時出願の米国特許出願第881,454(1986年7月2日出願)に記載されている。エステル化の程度の高いエステル、とりわけ完全にエステル化されたエステルは、ヒアルロン酸と異なり、例えばジメチルスルホキシドのような有機溶媒に易溶である。従って、例えば、HYのベンジルエステルは室温で200mg/ml程度、DMSOに溶解する。このようなある種の有機溶媒にたいする溶解性、並びに特別なそして著しい粘弾性により、生理食塩水に溶解性の、特に好みしい形の衛生、医療および外科材料を得ることができる。まず、有機溶媒中でHYエステルの溶液を得、ついでこの非常に粘度の高い溶液を最終製品に好みしい形に成形し、最後に

シリトリル異性体および10種のダルシトル異性体が付与される。

新規なエステルにおいて、「架橋結合」は、上記の様々な多価アルコールから導かれるが、すべての「架橋結合」が同じ多価アルコールから導かれるようによく架橋することが好ましい。

最も重要な新規エステルは二価アルコール、即ち、グリコール類、から導かれるものである。そのようなグリコール類としては、前述の炭素原子数が16個までのもの、とりわけ8個までのものが好ましく、特にエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、及びベンタシン、ヘキサン、ヘプタン、オクタンから導かれたグリコール類、及びそれらの位置異性体特に好みしい。しかしながら、そのようなグリコール類は1-3個の二重結合を有していてもよい。

架橋結合した基に付加的に存在し得る单エステル基は脂肪族系、芳香性脂肪族系、環状脂肪族系アルコールあるいは複素環式アルコールから導かれ、置換された、または置換されていない、ある

いは、飽和または不飽和であってよい。脂肪族系アルコールは例えば、炭素原子数3~4までの飽和または不飽和アルコールであってよく、又、アミノ、ヒドロキシ、アルデヒド、ケト、メルカブト、カルボキシ基のごとき他の遊離の機能的な基または機能的に修飾された基、あるいはこれらから導かれる基、例えば、ヒドロカルビルまたはヒドロカルビルアミノ基(ここに、又、これ以後「ヒドロカルビル」という語句は、 $-C_nH_{2n+1}$ タイプの一価の炭化水素基のみならず、「アルキレン」、 $-C_nH_{2n-1}$ または「アルキリデン」、 $>C_nH_{2n}$ 等の二価または三価の基をも意味するものとする)、エーテルまたはエスチル基、アセタールまたはケタール基、チオエーテルまたはチオエチル基、およびエステル化されたカルボキシ基またはカルバミジン基、および、または2個のヒドロカルビル基、ニトリル基またはハロゲンによって置換されたカルバミジン基等によって置換されていてよい。置換アルコールの内、上記の官能基から選択される1または2個を有するアルコールが好ま

イソブチル、 α -ブチルアルコール、アミルアルコール、ベンチル、ヘキシル、オクチル、ノニルおよびドデシルアルコールのような飽和かつ非置換アルコール、特に n -オクチル、 n -ドデシルアルコールのような直鎖アルコールである。

置換アルコールの内、好ましいのは既述の、さもなくば「架橋結合」の形成に使用されるグリコール類であるが、グリセリンのような多価アルコール、タルトロニルアルコールのようなアルデヒドアルコール、乳酸のようなカルボキシアルコール、例えば、 α -オキシプロピオン酸、グリコール酸、リゾ酸、酒石酸、クエン酸、アミノエタノール、アミノプロパノール、 n -アミノブタノール等のアミノアルコール類、及びそれらのアミノ基のジメチルおよびジエチル誘導体、コリン、ビロジニルエタノール、ビペリジニルエタノール、ビペラジニルエタノール、並びに n -アブロピルアルコールまたは、 n -ブチルアルコールの対応する誘導体、モノチオエチレングリコールまたはメルカブト基のエチル誘導体の如き、そのアル

しい。

上記のヒドロカルビルを含んだ基の内、炭素原子数が6個までのアルキルのごとき低級脂肪族基のものが好ましい。又、そのようなアルコール類は、その炭素原子数が酸素原子、窒素原子、または硫黄原子等のヘテロ原子によって中断されているよい。上記のアルコール群の内、本発明に限って優先的に用いられるのは、炭素原子数1~2、とりわけ6個までのものであって、置換された上記のヒドロカルビル基、記述のアミノ、エーテル、エステル、チオエーテル、チオエステル、アセタール基、炭素原子数4個までのアルキル基を有するケタール基で置換されたもの、又、エステル化されたカルボキシ基、置換されたカルバミジン基でも同様であり、ヒドロカルビル基は同数の炭素原子を有するアルキル、ここに、アミノまたはカルバミジン基は8個までの炭素原子を有するものである。これらのアルコールの内、第一にまたは真先に當たるべきものはメチル、エチル、ブロビル、イソブロビルアルコール、 n -ブチル、

キル誘導体も好ましい。例えば、飽和高級脂肪族アルコールの内、セチルアルコールやミリチルアルコール等が好ましいが、本発明の目的にとって特に好ましいのは1または2個の二重結合を有する高級不飽和アルコール、とりわけ、多くの精油に含有されておりシトロネロール、グランオール、ネロール、ネロリドール、リナロール、ファルネソール、及びフィトール等のテルペン類に親和性を有するアルコールである。不飽和低級アルコールの内、アリルアルコールおよびプロパルギルアルコールが有用である。

芳香性脂肪族アルコールの内、特記すべきは、唯一のベンゼン誘導基を有し、脂肪族の炭素原子数が最高4個であり、ベンゼン誘導基が1~3個のメチル基、水酸基またはハロゲン原子、とりわけ塩素、臭素、ヨウ素によって置換されており、脂肪族誘導基が遊離のアミノ基、モノまたはジメチル基、あるいはビロジニルまたはビペリジニン基から選択される1またはそれ以上の基によって置換されていることもあるすべてのアルコールである。

これらのアルコールの内、ベンジルアルコール及びフェニチアルコールが最も好ましい。

環状脂肪族系アルコール(環状脂肪族アルコール-脂肪族アルコールをも含めて)は、單環または多環系炭化水素から導かれ、炭素原子数が3-4個までのものであることが好ましい。置換アルコールの場合、置換基は脂肪族アルコールについて述べた置換基であってよい。

モノアニュラー(一本輪)環状炭化水素から導かれるアルコールの内、特記すべきは、炭素原子数1-2個までであって、環炭素原子数が5-7個の、メチル、エチル、プロピル、またはイソアロビル等の1-3個の低級アルキル基によって置換されていてよい。このようなアルコール群の内、特に好ましいのは、シクロヘキサノール、シクロヘキサンジオール、1,2,3-シクロヘキサントリオール、1,3,5-シクロヘキサントリオール(アロロタルシトール)、およびイノシトールである。炭素環アルコールは、環状または環状鎖が例えば、基:-O-、-S-、-N-及び-NH-によっ

ての製造に有用であり、本発明は、これらのすべてにおける使用例を包含するものである。

架橋エステルの型は、明らかに、それがおかれると用途に応じて選択される。通常、全てのヒアルロン酸がエステル化された、高いエステル化率の場合には親油性が増し、従って水溶性は減少する。治療または化粧品に用いるためには、充分な水溶性を有するが、ヒアルロン酸またはその塩に比べて親油性に優っているよう、エステル化の程度を調整することが重要である。通常、エステル化される成分そのものの分子量は、逆比例関係によって水への溶解性に影響するので、それを斟酌しておくべきである。医薬への使用に関する限り、親水性または親油性の程度は、処置すべき組織のタイプとの関連において考慮されるべきであり、例えば、皮膚の場合には、其皮性医薬である。

本発明の新規な架橋誘導体は、ヒアルロン酸に固有の性質に基づいて、例えば、ヒトの医療および医学における関節症の治療薬として用い得る。この場合、それらは薬理作用がまったく無いか、

て形成されるる基から選択される1-3個の異種原子のような1-3個の異種原子によって中断されおり、1またはそれ以上、特に1-3個の2重結合を有しており、環状脂肪族または環状脂肪族-脂肪族アルコールから導かれるとしてよく、従って、芳香環構造を有する複素環化合物に含まれる。それらはフルフリルアルコールのような簡単なアルコール、または多くのアルカロイド誘導体および多くの医薬に含まれているようなより複雑な構造のアルコールであってよい。

既述の如く、本発明の新規な架橋誘導体は、上記の同時出願に係る米国特許出願に記載のヒアルロン酸またはその塩、あるいは上記エステルに適した主要な適用例全てに使用しうる。従って、既に述べたように、この新規な誘導体は、特に、

- 1) 医薬
- 2) 医薬の製薬用試形剤
- 3) 化粧品及び化粧品用の試形剤
- 4) 衛生、医療、及び外科用のプラスティック製品

または無視しうる程度である多価アルコール、特に、炭素原子数2-8個の二価アルコールから導かれ、また、存在しうる他の单エステルは例え、炭素原子数8個までの一価脂肪族アルコールの如き薬理作用のないアルコールから導かれる。投与方法は非経口、より正確には、經皮筋投与が有効である。

本発明の他の架橋誘導体は、薬理作用のあるアルコールから導かれるものであってよく、このことは特に、それから誘導されている单エステルに関して正しい。それらの誘導体は、アルコールと質的に似通った性質を有しているが、活性度はより分化されており、バランスのよい、一定で規則的な薬理作用が確実なものとなっており、通常、著しい「遅延」効果を有している。また、他の架橋誘導体は、それ自身、薬理作用を有するかまたは有しない、2またはそれ以上の異なるタイプのアルコールによる单エステルを含有していてもよい。異なるタイプのアルコールを適当な割合に処方することにより、ヒアルロン酸の特異活性を有さず、

薬理学的に活性なアルコールの所見の活性、及び特性に関する上記の安定性と生物利用性を有する、薬理活性なアルコールのエステルを得ることができ。

本明細書に記載の薬理学的に活性なアルコールから導かれた誘導体において、架橋結合したヒアルロン酸分子は、基本的には薬理活性な成分の試形剤として作用するので、それらもまた、2)および3)群に分類され得る。新規な架橋誘導体は2)および3)の使用において、実質的に試形剤として作用するので、それらはまた、上記の治療上非活性な多価アルコールから導かれていることが好ましく、さらに、一個アルコールから導かれたエステル基は薬理活性の全く持たないことが好ましい。活性物質と新規誘導体との物理的混合して得られる医薬は、通常の医薬剤に含有されている成分及び試形剤をも含有していてよい。一個の活性物質の代わりに活性物質の結合物(アソシエーション)を用いてもよい。この種の医薬の内、特に重要なものは、ヒアルロン酸誘導体が試

ロング、ボラステロンである。その他の治療上活性なアルコールは、例えば、アセロラクトール、ビタミンD₃及びD₄、アノスリン、ラクトフラビン、アスコルビン酸、リボフラビン、チアミン及びバントテン酸等のビタミン類である。複数環アルコールの内、アトロビン、スコポタミン、シンコニン、シンコニジン、キニン、モルキン、コディン、ナロルフィン、N-アーピチルスコポールアンモニウムプロミド、アジュマリン、エフェドリン、イソプロテノール、エビネフィリンのようなフェニルエチルアミン、パーエフェナシン、ビボチアジン、カルフェナジン、ホモフェナジン、アセトフェナジン、フルフェナジン、N-ヒドロキシエチルプロメタジン、クロリドのようなフェノチアジン薬物、フルベンチキソール([flupentixol]及びクロベンチキソールのようなチオキサンチン医薬;メプロフェンジオールのような抜けいれん剤、オピブラモールのような抗精神薬、オキシベンゾジルのような制吐剤、カルベチジン、フェノビリジンおよびメタドールのような鎮痛剤;エトドロキ

形剤として作用し、局所活性を有する物質を含有している医薬である。

本発明の新規な誘導体内で架橋結合を形成せず、カルボキシ基のエステル化に用いられる薬理活性なアルコールは、既述のリストとは別個に、例えば、性ホルモンおよびその合成同族体、特にコルチコステロイド及びその誘導体等のステロイド類の如き脂肪族一環状脂肪族多価アルコールであり、例えば、エストラジオール及びそのメチル誘導体、1,7位におけるエチニルまたはプロピニル誘導体、1,7-エーメチル-テストステロン、1'1,2-デヒドロ-テストステロン、nor-ゲストレル、19-nor-テストステロン、19-nor-17-エーメチル-テストステロンのようなテストステロン及びその誘導体、サイプロテロン(cyproterone)のような抗ホルモン、コルチゾン、ハイゾロコルチゾン、デキサメザゾン、ベクメサゾン、パラメサゾン、フルメサゾン、フルオシノロン、クロベタゾール、ベクロメサゾン、アルファキソ

ンのような従属薬;ベンズヒドロール及びジフェメトキシンのような食欲誘進剤;ヒドロキシジンのようなマイナートランキライザー;シナメドリン、ジフィリン、メフェネシン、メトカルバモール、クロルフェネシン、2,2-ジエチル-3-ブロバンジオール、ダヤフェネシン、ヒドロルアミドのような筋弛緩剤;ジビリダモールおよびオキシフェドリンのような冠血管拡張剤;プロバノロール、チモロール、ビンドロール、ブブナロール、アテノロール、メトプロロール、プラクトロールのようなアドレナリン遮断薬;6-アザウリジン、シタラビン、フロクスウリジンのような抗生物質;クロラムフェニコール、チアンフェニコール、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、リンコマイシンのような抗生物質;ヨードキシリウジンのような抗ウイルス剤;イソニコチニルアルコールのような抗消炎脱水解痉緩和剤;スルオカルビレートのような試験脱水解痉緩和剤;チアラミドのような抗喘息および抗炎症剤;2-p-スルファニルアニノエタノールのようなルンファ剤を

も挙げることができる。

本明細書に記載の新規な架橋誘導体は、当然ながら、遊離のアルコールと同様の場合にも使用され得る。

本発明特に重要な点は、今日まで得られたものよりも安定な医薬を調製しうる点にある。従って、一方では、ヒアルロン酸自身に典型的な特徴によって用いられる架橋誘導体を調製する事ができ、例えば、関節内結合部のための潤滑剤として作用する架橋誘導体の製造、;遊離の脱と比べた場合、ヒアルロニダーゼにより安定であり、著しく作用が遮断されている誘導体の製造である。他方、上記の誘導体が治療活性のあるアルコールから導かれたエスチル基を含有することで「遮断」効果を有する薬物を得ることができ。これらの医薬において、薬理活性的なアルコールはエステラーゼによって極めてゆっくり器官中に放出される。前記4)に従って用いるためには、新規な架橋誘導体を、特に、薬理学的に不活性なアルコール、例えば、二価の飽和脂肪族アルコール、特に炭素原子数2-8個

一ル類についても考慮すべきであり、特に、香料あるいは匂い入りのクリームを調製するためには、芳香を有するアルコールについて考慮すべきである。

本発明にかかる全ての架橋誘導体において、「架構結合」されていない、またはエスチル化されていないカルボキシ基は、遊離または催化されていてよい。塩は、例えば、カリウムおよびとりわけナトリウムの如きアルカリ金属およびアンモニウム・カルシウムの如きアルカリ土類金属、又はマグネシウムおよびアルミニウム塩の如き無機塩基を含んでいるか、あるいは有機塩基、とりわけ、アゾ化された(*azotated*)塩基塩、従って、例えば脂肪族アミン、芳香性脂肪族アミン、環状脂肪族アミン、又は複素環式アミンを含有していてよい。これらの塩は、治療上許容し得るが、不活性なアミン、または治療活性を有するアミンから導かれ得る。

前者の内、特に考慮されるべきものは、脂肪族アミン、例えば、炭素原子数1-8個までのアルキ

の該アルコール、グリセリンおよび一価アルコール、とりわけ、脂肪族アルコールから調製するが、その他、上記の架構していない、カルボキシ基の部分的なエスチル化のための、一連のアルコールの内のどれかで調製してもよい。この最後の化合物群の内、とりわけ重要なのは、例えば、ビニルアルコールまたはアリルアルコールのような1またはそれ以上の二重結合を有する不飽和アルコール、およびその組合誘導体(特にポリビニルアルコールおよびグリセリン)である。この場合において、特定の使用目的に応じて混合エスチルを用いることができる。シクロヘキサンおよびシクロヘキサン、あるいはそれらの、より低級なアルキル、例えば、炭素原子数1-4個のアルキル、とりわけメチル基によって置換されている誘導体から導かれる脂肪族アルコールも有用である。

化粧品に用いには、上記の衛生、医療、及び外科的使用的に挙げた、エスチル化された基と実質上同様な化合物で架橋された誘導体を用いることが好ましい。また、上記のテルペンアルコ

ル基を有するモノ、ジ、およびトリアルキルアミン、または、脂肪族部分に同数の炭素原子を有するアリルアルキルアミンであって、ここに、アリルとは、1-3個のメチル基、ハロゲン原子または水酸基によって置換されていることもあるベンゼン基を意味する。塩形成のための生物学的に不活性な塩基は、環が窒素、酸素、硫黄からなる群から選択されるる異種原子によって中断されていることもある炭素原子数4-6個の環からなる單環式アルキレンアミンの如き環状化合物、例えば、ビペリジン、ビペラジン、またはモルホリンであってよく、あるいは、アミノエタノール、エチレンジアミン、エフェドリンまたはコリンのようなアミノまたは水酸基によって置換されているよい。

又、部分エスチルの4級アンモニウム塩、例えば、上記炭素原子数のテトラアルキルアンモニウム塩でもよく、この場合、第4アルキル基の炭素原子数が1-4個、例えばメチルである同タイプの塩が好ましい。

治療活性を利用して得るこれらの生物学的に活性なアミンには次に示す化合物群に含まれる、アゾ化された、および塩基性の薬物がある。アルカリド、ペプチド、フェノチアジン、ベンゾジアゼピン、チオキサンテン、ホルモン、ビタミン、抗けいれん剤、抗精神薬、制吐剤、麻酔薬、催眠薬、食欲減退剤、トランキライザー、筋油緩剤、冠血管拡張剤、抗新生物質、抗生物質、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗マラリア剤、炭酸脱水酵素阻害剤、非ステロイド系抗炎症剤、血管収縮剤、コリン作用薬、コリン拮抗物質、アドレナリン作動薬、アドレナリン遮断薬、ナルコチコン拮抗物質。

本明細書に記載したこれらの塩基性のアゾ化された基を有する薬物はすべて、エステルの使用例であると書いている。エステル化されていないカルボキシ基の、治療上活性な塩基による塩基化は、治療上活性なアルコールによるエステル化で得られる新規な架橋誘導体の試形剤機能を置き換える、あるいは強化し、従って、2)の治療用試形剤としての本発明の新規化合物の他の特別な使用例を示

ヒトへの使用を意图した製品を動物に適用しており、これらの作用域は常に明確に保証されているとは限らず、時には投与すべき情況の下でも、投与することが不適当な場合がある。そのような例は、通常、牛、羊、および山羊を飼う感染症である感染性角結膜炎、急性伝染性結膜炎または1日Kの治療の場合である。おそらく、これらの3種においては、特異的な病因学的因素が存在しており、更に詳しくは、牛において開発する主な微生物は、モラキセラ・ボビス(*Moraxella bovis*)である[しかし、羊マイコプラズマにおけるライノトラキティス・ウィルス(*Rhinotracheitis virus*)、山羊リケッチャアにおけるリケッチャアおよびクラミディアの如き他のウイルス起原の物質も除外すべきでない]。これらの疾患は急性症状を呈し、迅速に進行する:初期症状は眼瞼腫張と過剰の涙流を特徴とし、ついで、眼誌出、結膜炎および角膜炎に進み、これにはしばしば発熱、食欲減退および乳生産の減少を伴なうことが多い。特に深刻なのは角膜炎であって、最終段階では角膜穿

す。活性な塩基類は、化学量論量の塩基を付加することによって得られる中性、過剰量の塩基を付加することによって得られる塩基性塩、および不足量の塩基を付加することによって得られる酸類の両方、のいずれによっても、試形剤化される。

本発明に係る新規なヒアルロン酸誘導体は、局部または局部への使用に有用であり、とりわけ、眼科的使用において、角膜上皮への適合性に優れているので、感作作用を示す事なく、非常に良好な耐容性、特に有用である。更に、医薬を、粘弹性を有する濃縮溶液、または固体形の状態で医薬を投与すると、角膜上皮に、ホモジニアスで安定な、完璧な透通性と完全な吸着性を有する膜(フィルム)が得られるので、薬物の生物学的利用の延長が保証され、そのために、遮断効果を有する優れた製剤が得られることになる。

これらの眼科用薬物は、今日、獸医学において、化学物質を含有している専門的な薬物がないので、獸医学分野において極めて価値がある。実際には、

孔自身に至ることもある。臨床経過は数日から数週間に及ぶ。

化学物質の局部投与(しばしばステロイド系抗炎症剤を併用する)、および全身投与、例えば、オキシテトラサイクリンのようなテトラサイクリン類、クロキサシンやベンジルペニシリンのようなペニシリン類、カルファ剤、ポリミキシンB(ミコナゾールおよびブレゾニゾロンを併用する)、プロラムフェニコール、タイロシンおよびクロロマイセチン等の投与、の両者を含む広範囲に及ぶ化学物質を用いた治療が採用されている。疾患の局部治療は見掛け上単純であるが、今日までに用いられている眼科用製剤は1つのまたは別の理由から、誤分認或中に治療有効濃度の抗生物質またはカルファ剤を得ることができないので、依然として公然の問題を有している。このことは治療の場合、上記の動物における頭部の位置が著しく傾いていることから容易に理解し得るが、半固体製剤の場合であっても、その中に通常用いられている試形剤は角膜表面に付着するに必要な性

質を有していないので同様のことがいえる。このことは、通常、それらの活性成分濃度が、充分に高くないので、活性成を完全に分布させることができないことによる[分布勾配(グラディエント)の存在]。これらの従来の眼科用液剤の問題点は例えば、スラッターら(Slatter)、「Austr. vet. J., 1982, 59(3), p. 69-72」によって記述されている。本発明のエステルによればこれらの問題点を克服することができる。実際、眼用製剤中にヒアルロン酸を試形剤として存在すると、活性成分の濃度勾配のない、従って、完全にホモジニアスで透過性の、角膜上皮への付着性を有する感作作用の無い、活性成分と一緒にになって、優れた試形剤として作用し、透達効果をも有する優れた製剤を製造することができる。眼科治療に用いられる新規な誘導体を含有する薬物は主として縮瞳、傷の治癒、抗炎症、抗一微生物/抗生素質作中に関連している。抗生素質の例としては、アミノグリコシド、マクロライド、テトラサイクリンおよびペプチド、のような塩基性または非

シアラビニッシュド、トリフルオロチミジン、アシクロバ、エチルデオキシウリジン、プロモビニルデオキシウリジン、5-ヨード-5'-アミノ-2',5'-ジデオキシウリジンのような抗ウイルスおよび抗腫瘍剤;デキサメサゾン、ヒドロコートゾン、ブレゾニゾロン、フルオロメソロン、メドリソンおよびりん酸エステル等のそれらのエステルのようなステロイド系抗炎症剤;インドメタシン、オキシフェンブタゾン、フルルビプロフェンのような非ステロイド系抗炎症剤;上皮性成長ホルモンEGFのような傷治癒剤;ペノキシナート、プロパラカインおよびその塩等の局所麻酔剤;ピロカルビン、メタコリン、カリバミルコリン、アセクリジン、フィソステグミン、ネオスチグミン、デメカリウムおよびその塩等のコリン作動薬;アトロビンおよびその塩のようなコリン遮断剤;ノルアドレナリン、アドレナリン、ナファドリン、メトキサミンおよびその塩等のアドレナリン作動薬;プロバノロール、チモロール、ビンドロール、ブブナロール、アテノロール、メトプロロール、

塩基性抗生物質、例えば、グンタマイシン、ネオマイシン、ストレptomycin、ジヒドロストレptomycin、カナマイシン、アミカシン、トブラマイシン、スペクチノマイシン、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、カルボマイシン、スピラマイシン、オキシテトラサイクリン、ロリテトラサイクリン、バシトラシン、ポリミシンB、グラミシジン、コリスタン、クロラムフェニコール、リンコマイシン、パンコマイシン、ノボピオシン、リストセチン、クリングマイシン、アンフォテリシンB、ジセオファルビン、ニスタチン、並びにそれらの硫酸塩や硝酸塩等の塩、更には、同一内または相互間での会合物、あるいは下記の如き他の活性物質との会合物を挙げができる。

本発明に用いるのに有用な他の眼科用薬物はつぎの通りである:ジエチルカルバミジン、メベンダゾール、サルファセタミド、サルファジアジン、スルファイソキサゾール等のサルファ剤のような他の抗感染症剤;ヨードデオキシリジン、アデニ

オキシブレノロール、ブラクトロール、ブトキサミン、ソコロール、ブタドリン、ラベタロールおよびその塩等のアドレナリン遮断薬。

それ自身で、または活性な他の物質と一緒に皮膚科において用いられる活性物質の例はつぎの通りである:抗感染症剤、抗生素質、抗微生物剤、抗炎症剤、制細胞製剤、細胞毒素、抗ウイルス剤および麻酔薬のような治瘻薬、および透光(サンシールド)剤、脱臭剤、防腐剤および殺菌剤のような防御用物質。

眼科学および皮膚科学に関して述べられている例から類推して、本発明の医薬が、耳喉頭学、婦人科学、脈管学、神経学その他、直腸への作用の如く、局部の局所適用によって処置されるべき型の内臓官の病理学等の様々な医療分野で用いるのに適していると考えるのは合理的である。本発明の新規な誘導体を用いて非経口投与に適した、治療活性な物質の会合(アソシエーション)物を調製することができることはもちろんである。後者の場合、注射用の水溶液を得るために、低レベルに

架橋され、かつ／またはエヌテル化されたヒアルロン酸誘導体を選択する必要がある。極く僅かしか水に溶けないか、全く不溶の誘導体は、例えば油性溶液のような有機物質の溶液として投与する、活性物質含有化合物を形成するのに用いることができる。

本明細書に記載した局所投与型の医薬は唯2種の成分を混合物として、あるいは別個に含有する凍結乾燥粉末の如く固型の剤形で局所的に用いることができる。その様な固型剤形の医薬と処理すべき上皮との接触に際し、予めインピリトロで調整され、特定の上皮と同様の特性を有する溶液で多少の濃縮液を形成する、このことはまた本発明のもう一つの重要な点を示している。その様な溶液は蒸留水または滅菌食塩水の溶液であることが好ましく、また、ヒアルロン酸エヌテル、またはその他の他の高分子量の試験剤を含有していないことが好ましい。その様な溶液の濃度も広い制限域内で変化し得るものであり、例えば、2成分の個々について、並びにそれらの混合物または塗について、

中和する。

本発明のHYエヌテルの製造方法

本発明の新規な架橋誘導体は、カルボン酸類のエヌテル化に関する既知の方法によって製造することができ、例えば、過酢のヒアルロン酸を強い無機酸または酸性のイオン交換体等の触媒の存在下、上記の多価アルコールで処理するか、あるいは、無機または有機塩基の存在下、所望のアルコール残基を導入し得るエーテル化剤で処理することにより、製造され得る。エーテル化剤としては、文献に指示されているものを用いることができるが、特に、様々な無機酸または有機スルホン酸のエヌテル、水素酸、ヨウ化メチル、その他上記二個アルコールの基礎となっているアルキル基のハロゲン化アルキル等を用いる。

反応は、通常な溶媒、例えばアルコール、好ましくはカルボキシ基に導入すべきアルキル基に相当するアルコールの中で行われるが、ジオキサンの様なケトンやエーテル、あるいはジメチルスルホキシドの如き中性溶媒中でも進行し得る。塩基

0.01～7.5%の範囲とることができる。特に好ましいのは、既述の弾粘性を有する液体であり、例えば、薬物またはその構成成分を1.0～90%含有する溶液である。このタイプの薬物の特に重要なものは、眼科的な使用のために、特別な投与性物質または賦形剤その他の作用する物質の塗の如き付加物あるいは補助物質を含有していることもある、無水剤(凍結乾燥粉末)、並びに液状剤または水または生理食塩水中の希釈液の剤形のものである。

本発明の医薬は、それを適用すべき環境に適した酸性度、即ち、生物学的に耐容可能なpHのものを場合に応じて選択すべきである。pHは、例えば、上記のヒアルロン酸エヌテルの塩基性活性物質による塗では、多価塩、その塩、および塩基性物質自身の量を調整することにより調節される。從って、例えば、塩基性物質によるヒアルロン酸エヌテルの塗の酸性度が高すぎるときには、過剰の過酢の塩基を上記無機塩基(例、ナトリウムまたはカリウム、またはアンモニウム水)によって

としては、例えば、アルカリ土類、アルカリ土類金属またはマグネシウムの水和物、鉄の酸化物、またはこれらの金属のあるものの塩基性の塗(炭酸塩)、並びに有機塩基、ビリジンまたはコリジンの如き4級アゾ化塩基等を用いることができる。塩基の代りに、塩基型のイオン交換体を用いてよい。

他のエヌテル化法は、金属塩、あるいはアンモニウムまたは置換アンモニウム塩のような有機アゾ化塩基の塩類を用いる。アルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩を用いることが好ましいが、他の金属塩を用いることができる。上記のエーテル化剤はこの場合も適用され、溶媒についても同様のことがいえる。ジメチルスルホキシドおよびジメチルホルムアミドのような中性溶媒を用いるのが好ましい。これらのエヌテル化法は、当然、上記の单エヌテルの製造にも用いられる。

前記の同時出願の米国特許出願に記載した新規な、初めての方法では、ヒアルロン酸の单エヌテルに關し、これらのエヌテルは、ヒアルロン酸の

4級アンモニウム塩とエーテル化剤とを、ジアルキルスルホキシド、ジアルキルカルボキシリアミド、特に低級アルキルのジアルキルスルホキシド、とりわけジメチルスルホキシド、並びに下級脂肪族の低級アルキルジアルキルアミド、例えばジメチルまたはジエチルホルムアミドあるいはジメチルまたはジエチルアセトアミドのような中性溶媒中で反応を開始することにより好都合に製造される。反応は、温度約0°~100°、とりわけ、約25°~75°、例えば約30°で行うのが好ましい。エステル化は、記載した溶媒の1つ、例えばジメチルスルホキシドに溶かした上記のアンモニウム塩にエステル化剤を徐々に加えることによって行なうことが好ましい。

本発明の代表的な架橋エステルの製造に同一の方法を採用することができる。即ち、上記の多価アルコールから導かれるヒアルロン酸の4級アンモニウム塩に対するエーテル化剤により、2つのカルボキシ基間に架橋結合が形成される。出発物質の4級アンモニウム塩としては、1~6個の炭素

前に詳述した方法の1つの変法は、ジメチルスルホキシドの如き選適な溶媒に懸濁したヒアルロン酸のナトリウムまたはカリウム塩を、触媒量のヨウ化トリアルキルアンモニウムの如き4級アンモニウム塩の存在下、選適なエーテル化剤と反応させることからなる。本発明の新規なエステルの製造には、例えば、既のとさかのよう上の記の天然の供給源から抽出した膜の如く、どのような膜のヒアルロン酸を用いてもよい。その様な膜の製造は文献に記載されている。精製されたヒアルロン酸を用いることが好ましい。本発明においては、分子量が非常に異なる。有機材料からの抽出で直接得られた、完全な膜の分子量の、例えば、約900~8000から0.2%の間で大きく変化している分子量の分子百分率の、好ましくは5%~0.2%の間の分子百分率を含むヒアルロン酸を用いることが好ましい。これらの百分率は、文献記載の様々な方法、即ち、加水分解、酸化または酵素試薬、あるいは機械的な手法や照射の如き物理的な方法により得ることができ、従って、これらの精製工

原子を有するアルキル基の、低級なテトラアルキル化アンモニウム類を用いることが好ましい。ヒアルロン酸テトラブチルアンモニウムが使用に最適である。これらの4級アンモニウム塩は、ヒアルロン酸の金属塩、好ましくは上記の金属塩の内の1つ、特にナトリウムまたはカリウム塩を水溶液中で、4級アンモニウム塩によって塩化されたスルホン系樹脂と反応させることにより製造される。ヒアルロン酸テトラアルキルアンモニウムは溶出液を凍結乾燥することによって得られる。

低級アルキルから導かれるヒアルロン酸テトラアルキルアンモニウム、特に炭素原子数が1~6個のアルキル基からなるものは新規であり、これもまた本発明の目的である。予想外なことに、その様な塩は上記の中性溶媒に可溶性であることが分かり、従って、上記の新規な方法によるヒアルロン酸のエステル化が極めて容易であり、収量は大きい。従って、その様の方法によってのみ、エステル化すべきヒアルロン酸のカルボキシ基の数を正確に割当てることができる。

程中に始原的(prinordial)抽出物が形成されることが多い〔前記の文献、バルツラ、「コスマティック・アンド・トイレタリーズ」参照〕。得られた分子画分の分離および精製は、例えば、分子通過のようない既知の方法で行われる。

本発明に用いるのに適した精製HPLC画分の1つは、例えば、バルツによってリーフレット「ヘアロン(Healon)」-眼外科にそれらを用いるための指針ミラー(D. Miller)およびステッグマン(R. Steggmann)編、ジョン・ウィリー・アンド・サン(John Wiley & Sons), N Y 8 1 9 8 3: p. 5に記載されている「非炎症性ヒアルロン酸ナトリウム-N I F -NaHA」と命名されたものである。本発明のエステルを得る出発物質として特に重要なものは、ヒアルロン酸から得られる2つの精製画分であり、そのタイプの例は、既のとさから抽出された「ヒアラストチン(Hyalastine)」と「ヒアレクチン(Hyalectin)」と名付けられたものである。ヒアラストチン画分の平均の分子量は約50,000から100,000の間であるのに対

し、ヒアレクチンの平均分子量は約 500,000 から 730,000 の間である。これらの 2 部分と一緒にになった 1 つの部分も単離されており、平均分子量が約 250,000 から 350,000 であると特徴化された。この一緒にになった部分は特定の出発物質から得られる全ヒアルロン酸の収率(80%に匹敵)で得られるが、ヒアレクチン部分は出発物質 XY の 30%の収率で、また、ヒアラクチン部分は 50%の収率で得られる。これらの部分の製造は実施例 3-8 および 4-0 に記載されている。

新規なヒアルロン酸の架橋エステルにおいて、エステル化されていないカルボキシ基は遊離状態か、塩化されているか、あるいは部分的に塩化されていてよく、従って、様々な形の架橋産物が得られる。即ち、残余のカルボキシ基は遊離しているか塩化されているか、残余のカルボキシ基は完全にエステル化されているか、または部分的にエステル化されているかであり、この後者の場合、さらに残余の基は遊離であるか、または塩化され

によって中性、酸性または塩基性である。

また本発明によれば、特に、既に得られた塩(精製され、無定形等の無水状態であるかもしれない)を出発物質として、処置すべき粗縛に接触させときに、ゼラチン状の物性の、粘膜な、弾性を有する濃厚な水溶液を構成する上記のタイプの薬物を調製することができる。これらの性質はより大きく希釈されても維持されており、これを、試形剤、および pH および浸透圧を調整するための他の試物等の添加物を加えて水または生理食塩水の、多少濃縮された溶液として、上記の無水塩の代りに用いることができる。塩を用いて、ゲル、導入体、クリームまたは軟膏を、これらの医薬製剤の通常の製造に用いられる試形剤や成分を含ませて調製し得ることは当然である。

本発明の新規な生産物の内、上記のエステルおよびその塩並びに以下の例示的な実施例に示した化合物は特定の事項であり、本発明を限定するものではない。

本発明はまた新規なエステルおよびその塩の製

ていよい。この様に、物性、特に、酸性度、粘弹性、およびゲル形成能に関する物性において異なる、あらゆる範囲の生産物を得ることができる。特定の pH の薬物を調製するためには、遊離状態に保つべきカルボキシ基の数が重要であろう。

新規な誘導体の塩の製造は、例えば、ヒアルロン酸誘導体に、塩基としての計算量のアルカリ性水和物等、またはアルカリ金属の塩基性の塩(炭酸塩または重炭酸塩)を使用することにより行うことができる。このことは、まず、ヒアルロン酸誘導体の水溶液と塩基の水溶液を調製し、これらの物質をイオン交換体を用いてそれらの塩の水溶液から除浄し、2 比例を低価で保ら(例、0° ~ 20°)、得られた塩が水に易溶の場合には凍結乾燥するが、難溶性の塩の場合には遠心、離過またはデカンテーションによって分離した後、乾燥することができる。有機塩基の場合、新規な架橋導体を試形剤として、その様な塩基と新規な誘導体との塩として得られる薬物は、塩基を化学量論量を加えるか、あるいは塩基が不足か過剰であるか

過方法の改良法であって、その方法はどの段階で過切てもよく、または、中間体を出発物質として行う場合には、残りの段階が有効であり、あるいは、出発物質を系中で形成して行うことをも含む。

本発明を以下の実施例により説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではなく、実施例中、DMSO はジメチルスルホキシドを表す、実施例に記載した生成物は多価アルコールによってエステル化された、ある割合のヒアルロン酸のカルボキシ基を有し、残余の塩基化され、かつ／または一個アルコールでエステル化されたカルボキシ基を有する本発明の架橋エステルを含有する。表 1 は、実施例 1 ~ 3-7 で得られた様々な生成物を示すものであって、明記した多価アルコールでエステル化されたカルボキシ基の数、およびナトリウム／または明記した一個アルコールでエステル化されたカルボキシ基の数が記載されている。

実施例1 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、高度に除菌した条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0xEq(ミリ当量))のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8gに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加え(0.5mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-3ジヨードプロパン0.074gを加え(0.25mM、0.5xEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、遠心して沈殿物を分離し、アセトン／水(5:1)100mlで3回、ア

Y)の製造。

窒素雰囲気下、高度に除菌した条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0xEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8gに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加え(0.5mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-3ジヨードプロパン0.148gを加え(0.5mM、1xEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、遠心して沈殿物を分離し、アセトン／水(5:1)100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.99gが得られる。

セトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.01gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフ(Cundiff)らの方法【アナリチカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.) 33, 1028, 1961】に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.56%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は0.574%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレンを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。この方法によれば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.24xEq/gである(理論値は0.25)。

実施例2 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

エトキシル基定量法をクンディフらの方針(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.56%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は0.574%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレンを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。この方法によれば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.36xEq/gである(理論値は0.374)。

実施例3 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、高度に除菌した条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0xEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8gに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加え(0.5mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌

する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え(1nM、2nEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／冰浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.00mLにNaCl@2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、滤過して沈澱物を分離し、アセトン／水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.98gが得られる。

エトキシリ定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.56%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は0.574%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaO

1.00mLにNaCl@2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、滤過して沈澱物を分離し、アセトン／水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.00gが得られる。

エトキシリ定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが1.08%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は1.15%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタリインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.735nEq/gである(理論値は0.747%)。

実施例5 エタノールにより部分的にエステル化

Hは、指示薬としてフェノールフタリインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。この方法によれば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.61nEq/gである(理論値は0.623%)。

実施例4 エタノールにより部分的にエステル化
され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素ガス雰囲気下、高度に除湿した条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0nEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO@4.8mLに溶解する。ヨウ化エチル0.156gを加え(1nM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え(1nM、2nEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／冰浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水

され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素ガス雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0nEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO@4.8mLに溶解する。ヨウ化エチル0.312gを加え(2nM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え(1nM、2nEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／冰浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.00mLにNaCl@5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、滤過して沈澱物を分離し、アセトン／水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.01gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.18%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は2.29%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.98±Eq/gである(理論値は0.995)。

実施例6 エタノールにより部分的にエステル化

され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、高圧に陥れた条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8

Hを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.43±Eq/gである(理論値は1.49)。

実施例7 エタノールにより部分的にエステル化

され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8gに溶解する。ヨウ化エチル0.934gを加え(6mM)、得られた溶液を30°Cで15時間還流する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え(1mM、2±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.0±gにNaCl±2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、誰過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)1.0±gで3回、アセトン1.0±gで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.00gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.5%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は4.57%)。過剰量の0.1N NaOH

をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.0±gにNaCl±2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、誰過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)1.0±gで3回、アセトン1.0±gで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.03gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが6.74%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は6.83%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.96±Eq/gである(理論

値は1.9.8)。

実施例8 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0gEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8mLに溶解する。ヨク化エチル0.170gを加え(7.5mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え(1mM、2Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.00mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン5.00mLを加え、濃過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)1.00mLで3回、ア

25°Cの温度で、HY(1.0gEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8mLに溶解する。ヨク化エチル0.624gを加え(4mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-3ジヨードプロパン0.592gを加え(2mM、4Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.00mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン5.00mLを加え、濃過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.99gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノ

セトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.02gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが8.46%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は8.52%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は2.28%Eq/gである(理論値は2.34%)。

実施例9 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、

アセトン5.00mLを加え、濃過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

ヨク化エチル4.42%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は4.57%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.96%Eq/gである(理論値は1.99%)。

実施例10 エタノールにより部分的にエステル化され、1-4ブタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0gEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8mLに溶解する。ヨク化エチル0.312gを加え(2mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-3ジヨードブタン0.310gを加え(1mM、2Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°C

で24時間放置する。

洗ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、誰通して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.02gが得られる。

エトキシリル定量法をクエンディフラの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.3%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は2.28%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフルタレンを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このよ

アセトン500mLを加え、誰通して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.95gが得られる。

エトキシリル定量法をクエンディフラの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.25%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は2.28%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフルタレンを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.41mEq/gである(理論値は1.48)。

実施例1-2 エタノールにより部分的にエスセル化され、1-4ブタジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

うな方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.97mEq/gである(理論値は0.99)。

実施例1-1 エタノールにより部分的にエスセル化され、1-4ブタジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0mEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO24.8mLに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え(4mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-4ジヨードブタン0.310gを加え(1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

洗ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0mEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO24.8mLに溶解する。ヨウ化エチル0.930gを加え(6mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-4ジヨードブタン0.310gを加え(1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

洗ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、誰通して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.98gが得られる。

エトキシリル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが6.69%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は6.81%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.9±Eq/gである(理論値は1.97%)。

実施例1-3 エタノールにより部分的にエステル化され、1-6ヘキサンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 2.48mLに溶解する。ヨウ化エチル0.312gを加え(2mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1

指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.96±Eq/gである(理論値は0.985%)。

実施例1-4 エタノールにより部分的にエステル化され、1-6ヘキサンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 2.48mLに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え(2mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-6ジブロモヘキサン0.244gを加え(1mM、2±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水

-6ジブロモヘキサン0.244gを加え(1mM、2±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.00mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、誰通して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.05gが得られる。

エトキシリル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.18%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は2.27%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、

1.00mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、誰通して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.02gが得られる。

エトキシリル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.46%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は4.52%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.43±Eq/gである(理論値は1.47%)。

実施例1-5 エタノールにより部分的にエステル

化され、 $1 - 6$ へキサンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ波光下、 25°C の温度で、HY(1.0mEq)のテトラブチルアンモニウム塩 6.21g を、DMSO 24.8mL に溶解する。ヨウ化エチル 0.934g を加え(6nM)、得られた溶液を 30°C で 1.5 時間搅拌する。 $1 - 6$ ジプロモヘキサン 0.244g を加え(1mM 、 2mEq に相当)、均一にした後、この溶液を 30°C で 2.4 時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水 1.0mL にNaCl 2.5g を溶かした水溶液を加える。

アセトン 5.00mL を加え、遠心して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1) 1.00mL で 3 回、アセトン 1.00mL で 3 回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

溶解する。ヨウ化エチル 0.077g を加え(0.5nM)、得られた溶液を 30°C で 1.5 時間搅拌する。 $1 - 6$ ジプロモオクタン 0.068g を加え(0.25nM 、 0.5mEq に相当)、均一にした後、この溶液を 30°C で 2.4 時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水 1.00mL にNaCl 2.5g を溶かした水溶液を加える。

アセトン 5.00mL を加え、遠心して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1) 1.00mL で 3 回、アセトン 1.00mL で 3 回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物 3.99g が得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが 0.54% (v/v)含まれていることが分かった(理論値は 0.571%)。過剰量の 0.1N NaOH

これにより、標題に示した化合物 4.00g が得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが 6.68% (v/v)含まれていることが分かった(理論値は 6.76%)。過剰量の 0.1N NaOH を用いて 50°C で 3.0 分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレンを用いた 0.1N HCl による滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 1.91mEq/g である(理論値は 1.96%)。

実施例16 エタノールにより部分的にエステル化され、 $1 - 8$ オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ波光下、 25°C の温度で、HY(1.0mEq)のテトラブチルアンモニウム塩 6.21g を、DMSO 24.8mL に

OHを用いて 50°C で 3.0 分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレンを用いた 0.1N HCl による滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 0.23mEq/g である(理論値は 0.25%)。

実施例17 エタノールにより部分的にエステル化され、 $1 - 8$ オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ波光下、 25°C の温度で、HY(1.0mEq)のテトラブチルアンモニウム塩 6.21g を、DMSO 24.8mL に溶解する。ヨウ化エチル 0.077g を加え(0.5nM)、得られた溶液を 30°C で 1.5 時間搅拌する。 $1 - 8$ ジプロモオクタン 0.136g を加え(0.5nM 、 1mEq に相当)、均一にした後、この溶液を 30°C で 2.4 時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシ

ル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl2.5gを溶かした水浴液を加える。

アセトン500mLを加え、淮過して沈殿物を分離し、アセトン／水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.97gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.55%(\pm /v)含まれていることが分かった(理論値は0.569%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレンを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。

このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.35±Eq/gである

セトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.05gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.55%(\pm /v)含まれていることが分かった(理論値は0.564%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレンを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。

このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.60±Eq/gである(理論値は0.61%)。

実施例19 エタノールにより部分的にエステル化され、I-8オクタングリオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、

(理論値は0.37%)。

実施例18 エタノールにより部分的にエステル化され、I-8オクタングリオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のテトラブチルアンモニウム塩0.21gを、DMSO24.8mLに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加え(1mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。I-8ジプロモオクタン0.272gを加え(1mM、2±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl2.5gを溶かした水浴液を加える。

アセトン500mLを加え、淮過して沈殿物を分離し、アセトン／水(5:1)100mLで3回、ア

25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のテトラブチルアンモニウム塩0.21gを、DMSO24.8mLに溶解する。ヨウ化エチル0.156gを加え(1mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。I-8ジプロモオクタン0.272gを加え(1mM、2±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl2.5gを溶かした水浴液を加える。

アセトン500mLを加え、淮過して沈殿物を分離し、アセトン／水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.01gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノ

ールが 1.09% (v/v) 含まれていることが分かった(理論値は 1.13%)。過剰量の 0.1N NaOH を用いて 50°C で 30 分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量の NaOH は、指示薬としてフェノールフタレインを用いた 0.1N HCl による滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 0.70±Eq/g である(理論値は 0.73%)。

実施例 2-0 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8 オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°C の温度で、HY(1.0±Eq) のテトラブチルアンモニウム塩 6.21g を、DMSO 24.8mL に溶解する。ヨウ化エチル 0.312g を加え(2 mM)、得られた溶液を 30°C で 15 時間搅拌する。1-8ジプロモオクタン 0.272g を加え(1 mM、2±Eq に相当)、均一にした後、この溶液を 30

うな方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 0.96±Eq/g である(理論値は 0.98%)。

実施例 2-1 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8 オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°C の温度で、HY(1.0±Eq) のテトラブチルアンモニウム塩 6.21g を、DMSO 24.8mL に溶解する。ヨウ化エチル 0.624g を加え(4 mM)、得られた溶液を 30°C で 15 時間搅拌する。1-8ジプロモオクタン 0.272g を加え(1 mM、2±Eq に相当)、均一にした後、この溶液を 30°C で 24 時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水 100mL に NaCl 2.5g を溶かした水溶液を加える。

0°C で 24 時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水 100mL に NaCl 2.5g を溶かした水溶液を加える。

アセトン 500mL を加え、遠心して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1) 100mL で 3 回、アセトン 100mL で 3 回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物 4.05g が得られる。

エトキシル基定量法をクエンディフラの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが 2.05% (v/v) 含まれていることが分かった(理論値は 2.25%)。過剰量の 0.1N NaOH を用いて 50°C で 30 分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量の NaOH は、指示薬としてフェノールフタレインを用いた 0.1N HCl による滴定によって測定する。このよ

アセトン 500mL を加え、遠心して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1) 100mL で 3 回、アセトン 100mL で 3 回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物 3.99g が得られる。

エトキシル基定量法をクエンディフラの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが 4.39% (v/v) 含まれていることが分かった(理論値は 4.49%)。過剰量の 0.1N NaOH を用いて 50°C で 30 分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量の NaOH は、指示薬としてフェノールフタレインを用いた 0.1N HCl による滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 1.43±Eq/g である(理論値は 1.46%)。

実施例2-2 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0xEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO2.48mLに溶解する。ヨウ化エチル0.934gを加え(6nM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-8ジプロモオクタン0.272gを加え(1nM、2nEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、遠過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

アンモニウム塩6.21gを、DMSO2.48mLに溶解する。ヨウ化エチル1.170gを加え(7.5nM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-8ジプロモオクタン0.272gを加え(1nM、2nEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、遠過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.03gが得られる。

エトキシリル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが8.27%(v/v)含まれていることが分かった。

る。

これにより、標題に示した化合物4.10gが得られる。

エトキシリル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが6.66%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は6.72%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.89xEq/gである(理論値は1.94%)。

実施例2-3 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0xEq)のテトラブチル

た(理論値は8.38%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は2.05xEq/gである(理論値は2.3%)。

実施例2-4 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0xEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO2.48mLに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え(4nM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-8ジプロモオクタン0.544gを加え(1nM、2nEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

挿ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、誰過して沈殿物を分離し、アセトン／水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.15gが得られる。

エトキシリ基定量法をクンディフらの方法に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.36%(*/*)含まれていることが分かった(理論値は4.42%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能である。

分離し、アセトン／水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.12gが得られる。

エトキシリ基定量法をクンディフらの方法に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.12%(*/*)含まれていることが分かった(理論値は2.24%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.94%Eq/gである(理論値は0.97%)。

実施例2-5 エタノールにより部分的にエステル化され、I-10デカンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

り、その含有量は1.90%Eq/gである(理論値は1.92%)。

実施例2-5 エタノールにより部分的にエステル化され、I-10デカンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0mEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8mLに溶解する。ヨウ化エチル0.312gを加え(2mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。I-10ジプロモデカサン0.300gを加え(I=1M、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

挿ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mLを加え、誰過して沈殿物を分

離し、アセトン／水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.12gが得られる。

エトキシリ基定量法をクンディフらの方法に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.12%(*/*)含まれていることが分かった(理論値は2.24%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.94%Eq/gである(理論値は0.97%)。

実施例2-6 エタノールにより部分的にエステル化され、I-10デカンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

これにより、標題に示した化合物4.10gが得られる。

エトキシリ基定量法をクンディフらの方法に従って行ない、アセトン／水(5:1)100mLで3回、アセトン100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.10gが得られる。

て行ない、得られた化合物にはエタノールが4.36%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は4.46%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.43mEq/gである(理論値は1.45%)。

実施例2.7 エタノールにより部分的にエステル化され、1-10デカンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0mEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8mLに溶解する。ヨウ化エチル0.934gを加え(6mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。1-10ジプロモデカン0.300gを加え(1mM、HClによる滴定によって測定する)。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.87mEq/gである(理論値は1.93%)。

実施例2.8 エタノールにより部分的にエステル化され、 α, α' -ペラキシレンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0mEq)のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8mLに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え(4mM)、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。 α, α' -ジプロモ- p -キシリソ-0.264gを加え(1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

我々のテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水10.0mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加え

2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

我々のテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水10.0mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン50.0mLを加え、練過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)10.0mLで3回、アセトン10.0mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.12gが得られる。

エトキシル基定量法をクエンディフらの方法に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.5%(v/v)含まれていることが分かった(理論値は4.67%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このよう

な方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.36mEq/gである(理論値は1.47%)。

実施例2.9 ベンジルアルコールにより部分的にエステル化され、1-8オクタンジ

オールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、
25°Cの温度で、HY(1.0×Eq)のテトラブチル
アンモニウム塩6.21gを、DMSO 2.48mLに
溶解する。臭化ベンジル0.342gを加え(2 mM)
、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。ジ
プロモオクタン0.272gを加え(1 mM、2×Eq
に相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで2
4時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシ
ル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、
水／水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水
1.00mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加え
る。

アセトン500mLを加え、滤過して沈殿物を分
離し、アセトン／水(5:1)1.00mLで3回、ア
セトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥す
る。

これにより、標題に示した化合物4.15gが得
られる。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシ
ル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、
水／水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水
1.00mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加え
る。

アセトン500mLを加え、滤過して沈殿物を分
離し、アセトン／水(5:1)1.00mLで3回、ア
セトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥す
る。

これにより、標題に示した化合物4.11gが得
られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで3
0分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析
を行う。過剰量のNaOH⁻、指示薬としてフェ
ノールフタリエンを用いた0.1N HClによる
滴定によって測定する。このような方法に従えば、
全エステル基の測定が可能であり、その含有量は
0.92×Eq/gである(理論値は0.95)。

実施例3-1 1-3ブロバンジョールにより部分
的に架橋されたヒアルロン酸(HY)

られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで3
0分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析
を行う。過剰量のNaOH⁻は、指示薬としてフェ
ノールフタリエンを用いた0.1N HClによる
滴定によって測定する。このような方法に従えば、
全エステル基の測定が可能であり、その含有量は
0.93×Eq/gである(理論値は0.95)。

実施例3-2 ベンジルアルコールにより部分的に
エステル化され、α, α'-パラキシ
レンジオールにより部分的に架橋さ
れたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、
25°Cの温度で、HY(1.0×Eq)のテトラブチル
アンモニウム塩6.21gを、DMSO 2.48mLに
溶解する。臭化ベンジル0.342gを加え(2 mM)
、得られた溶液を30°Cで15時間搅拌する。α,
α'-ジプロモ-*p*-キシリレン0.264gを加え(1
mM、2×Eqに相当)、均一にした後、この溶液を
30°Cで24時間放置する。

の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、
25°Cの温度で、HY(1.0×Eq)のテトラブチル
アンモニウム塩6.21gを、DMSO 2.48mLに
溶解する。1-3ジヨードブロバン0.296gを
加え(1 mM、2×Eqに相当)、均一にした後、こ
の溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシ
ル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、
水／水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水
1.00mLにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加え
る。

アセトン500mLを加え、滤過して沈殿物を分
離し、アセトン／水(5:1)1.00mLで3回、ア
セトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥す
る。

これにより、標題に示した化合物3.98gが得
られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで3
0分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析

を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.47±Eq/gである(理論値は0.499)。

実験例3.2 1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遠光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のトラプチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8mLに溶解する。1-3ジヨードプロパン0.740gを加入(2.5mM、5±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.00mLをNaCl 2.5gを溶かした水浴液を加える。

アセトン500mLを加え、錯過して沈殿物を分離する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.00mLをNaCl 2.5gを溶かした水浴液を加える。

アセトン500mLを加え、錯過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.87gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.97±Eq/gである(理論値は2.00)。

実験例3.4 1-4ブタンジオールにより部分的

離し、アセトン/水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.89gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.21±Eq/gである(理論値は1.25)。

実験例3.5 1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、高湿度で強烈した条件下かつ遠光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8mLに溶解する。1-3ジヨードプロパン1.184gを加え(4mM、8±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遠光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO 24.8mLに溶解する。1-4ジヨードブタン0.310gを加入(1mM、2±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水1.00mLをNaCl 2.5gを溶かした水浴液を加える。

アセトン500mLを加え、錯過して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)1.00mLで3回、アセトン1.00mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.00gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで3

0分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.492±Eq/gである(理論値は0.497)。

実施例3-5 1-6ヘキサンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)

の製造。

空素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のテトラブチルアンモニウム塩5.21gを、DMSO 24.8mlに溶解する。テトラブチルアンモニウム・ヨウ化物塩0.370gを加え(1nM)、得られた溶液を20°Cで1時間搅拌する。1-6ジプロモヘキサン0.244gを加え(1nM、2±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、

25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のテトラブチルアンモニウム塩5.21gを、DMSO 24.8mlに溶解する。テトラブチルアンモニウム・ヨウ化物塩0.370gを加え(1nM)、得られた溶液を20°Cで1時間搅拌する。1-8ジプロモオクタン0.272gを加え(1nM、2±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水10.0mlにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン50.0mlを加え、撹拌して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)10.0mlで3回、アセトン10.0mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.02gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析

水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水10.0mlにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン50.0mlを加え、撹拌して沈殿物を分離し、アセトン/水(5:1)10.0mlで3回、アセトン10.0mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.01gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50°Cで30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.486±Eq/gである(理論値は0.494)。

実施例3-6 1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)

の製造。

空素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、

を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.478±Eq/gである(理論値は0.490)。

実施例3-7 1-10デカジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)

の製造。

空素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25°Cの温度で、HY(1.0±Eq)のテトラブチルアンモニウム塩5.21gを、DMSO 24.8mlに溶解する。ヨウ素0.369gを加え(1nM)、得られた溶液を20°Cで1時間搅拌する。1-10ジプロモデカン0.300gを加え(1nM、2±Eqに相当)、均一にした後、この溶液を30°Cで24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/水浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水10.0mlにNaCl 2.5gを溶かした水溶液を加え

る。

アセトン 500mLを加え、練過して沈殿物を分離し、アセトン／水(5:1)100mLで3回、アセトン 100mLで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物 3.99g が得られる。

過剰量の 0.1N NaOH を用いて 50°C で 30 分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量の NaOH は、指示薬としてフェノールフタレンを用いた 0.1N HCl による滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 0.476 × Eq/g である(理論値は 0.487)。

実験例 3.7.A. オクタンジオールおよびカルチゾン

ンにより混同して部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY) [オクタンジオールによりエステル化されたカルボキシル基 40%、カルチゾン(C₁₁)によりエステル化されたカルボキシル基 20%、塩化されたカルボ

キシル基 40%] の製造。

HY のテトラブチルアンモニウム塩(分子量 125,000)6.2g (1.0 × Eq に対応) を、ジメチルスルホキシド 310mL に恒温 25°C にて溶解し、1-エジプロモオクタン 1.09g (4 × Eq) を加え、得られた溶液を 30°C にて 24 時間放置する。2-イソブロモ-4-ブレグナン-17α-1-3,11,20-トリオノン 0.85g (5 × Eq) を加え、この溶液を 30°C にて 24 時間放置する。

次いで、塩化ナトリウム 5g の水溶液(100mL)を加え、得られた混合物を、一定速度で攪拌させながらアセトン 2,000mL にゆっくりと注加する。練過して得た沈殿物を、アセトン／水(5:1)100mL で 3 回、アセトン 100mL で 3 回洗浄し、最後に 30°C で 8 時間減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物 4.5g が得られる。

Na₂CO₃ の水性アルコール溶液を用いて緩やかにアルカリ性加水分解を行い、クロロホルムで抽出した後、ブリティッシュ・ファーマコピア(B

ritish Pharmacopeia)[1980, 224頁]に従ってカルチゾンの定量を行った。

第 1 頁

各種架橋化合物の粗度(パーセンテージ(百分率))

実験例 番号	エステル化 百分率 ^{a)}	架橋 百分率 ^{b)}	塩化 百分率 ^{c)}
1	5 / CH ₂ -CH ₂ -	5 / -(CH ₂) ₂ -	90
2	5 / CH ₂ -CH ₂ -	10 / -(CH ₂) ₂ -	85
3	5 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	75
4	10 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	70
5	20 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	60
6	40 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	40
7	80 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	20
8	75 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	5
9	40 / CH ₂ -CH ₂ -	40 / -(CH ₂) ₂ -	20
10	20 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	60
11	40 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	40
12	60 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	20
13	20 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	60
14	40 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	40
15	60 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	20
16	5 / CH ₂ -CH ₂ -	5 / -(CH ₂) ₂ -	90
17	5 / CH ₂ -CH ₂ -	10 / -(CH ₂) ₂ -	85
18	5 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	75
19	10 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	70
20	20 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	60
21	40 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	40
22	60 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	20
23	75 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	5
24	40 / CH ₂ -CH ₂ -	40 / -(CH ₂) ₂ -	20
25	20 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	60
26	40 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	40
27	60 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	20
28	40 / CH ₂ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂ -O-CH ₂) ₂ -	40
29	20 / -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₂ -	60

30	20 / -CH ₂ -	20 / -(CH ₂ -O-CH ₂) ₂ -	80
31	-	20 / -(CH ₂) ₂ -	80
32	-	50 / -(CH ₂) ₂ -	50
33	-	80 / -(CH ₂) ₂ -	20
34	-	20 / -(CH ₂) ₂ -	80
35	-	20 / -(CH ₂) ₂ -	80
36	-	20 / -(CH ₂) ₂ -	80
37	-	20 / -(CH ₂) ₂ -	80

a) 数字は右列の基によってエステル化されたカルボキシル基の百分率

b) 数字は右列の基によって架橋されたカルボキシル基の百分率

c) 数字はナトリウムによって塩化されたカルボキシル基の百分率

**実施例3-8 炎症作用を持たないヒアラスチン
面分とヒアレクチン面分との混合物を得る方法**

新鮮な、または凍結した鶏のとさか(300g)をミンサーで刻んだ後、機械的なホモジナイザーで注意深くホモジナイズする。この様にして得られたペーストをA I S Iステンレス製の容器またはグラスに入れ、10容量の無水アセトンで処理する。全体を50rpmで8時間搅拌する。12時間放置して分離させた後、アセトンを吸い上げて除去する。捨てたアセトンの温度が適正になるとアセトン抽出を繰り返す(カール・フィッシュ法)。次いで、全体を遠心し、適当な温度で5~8時間減圧乾燥する。かくして鳥とさかの乾燥粉末約500~600gが得られる。

乾燥粉末300gを、りん酸バッファーで緩衝化した水性溶媒中で、過量の塩酸システィンの存在下、パバイン(0.2g)により酵素消化する。60~65°Cの定温において、60rpmで24時間搅拌する。次いで、全体を25°Cに冷却してセテ

5%セチルビリジニウム・クロライドを含んだ0.05M塩化ナトリウム溶液3Lの入った容器に集める。

60rpmで60分間搅拌し、温度を2時間、25°Cの定温に保つ。上液を遠心して除く。0.05%セチルビリジニウム・クロライドを含んだ0.1M塩化ナトリウム溶液を用いて数回、この工程を繰り返す。混合物を遠心し、上清を捨てる。沈殿を0.5%セチルビリジニウム・クロライドを含んだ0.30M塩化ナトリウム溶液(3L)に分散させる。この混合物を搅拌し、沈殿と透明な液体の両者を集め。沈殿については、同一の水溶液0.5Lを用いて3回抽出を繰り返す。

最後に、残渣沈殿を捨て、1個の容器に透明な液体をとる。搅拌しながら液体の温度を50°Cにする。次いで、液体を塩化ナトリウムで0.23Mにする。セチルビリジニウム・クロライド1gを加え、12時間搅拌を続ける。

混合物を25°Cに冷却した後、まずCeliteRで、次にフィルターで滤過する。次いで、分子筛

イト(CeliteR)(60g)を加え、更に1時間搅拌を続ける。得られた混合物を、透明な液体が得られるまで滤過する。この透明な液体を分子排除限界30,000のメンブランで分子量30,000以上の分子を得る。

限外滤過される生成物に蒸留水を連続的に加えながら、元の体積の5~6倍容量を限外滤過する。水の添加を保留し、元の体積の1/3に減少されるまで限外滤過を続ける。塩化ナトリウムを加えて残りの液体を0.1M塩化ナトリウムとし、温度を50°Cにする。60rpmで搅拌しながらセチルビリジニウム・クロライド45gを加える。80分間搅拌した後、CeliteR50gを加える。搅拌下、全体の温度を25°Cにし、析出した沈殿を遠心して集める。得られた沈殿を0.5%セチルビリジニウム・クロライドを含んだ0.1M塩化ナトリウム溶液(5L)に懸滴する。これを50°Cで60分間搅拌する。次いで温度を25°Cにして沈殿を遠心する。3回洗浄を行い、最後に、0.

除外限界30,000のメンブランで分子限外滤過し、0.33M塩化ナトリウムを加えて初期容量の3倍の容量で限外滤過する。塩化ナトリウム溶液の添加を中止して容量を1/4に減少する。このようにして滤過した溶液を3容量のエタノール(9.5%)と一緒に25°Cで搅拌(60rpm)すると沈殿が析出する。遠心して沈殿を集め、上清を捨てる。沈殿を0.1M塩化ナトリウム溶液1Lに溶かし、3容量の9.5%エタノールで沈殿を繰り返す。沈殿を採取し、まず7.5%エタノールで3回、次いで無水エタノールで3回、最後に無水アセトンで3回洗浄する。

このようにして得られる生成物(ヒアラスチン+ヒアレクチン)の平均の分子量は250,000~350,000である。

HYの収率は最初の新鮮な組織に対して0.6%に相当する。

実施例3-9 実施例3-8に記載の方法で得られた混合物からヒアラスチン面分を得る方法

実験例3-8 に記載の方法で得られた混合物を発熱物質不含の蒸留水に、水 1 mL について生成物 1.0 mg の割合で溶かす。得られた溶液を分子篩脱限界 200,000 のフィルターメンブランを用い、メンブランの頂部から水を加えることなく、濃縮法で分子通過する。分子篩脱限界 200,000 のメンブランで限外通過を行うと、この間に、2,000,000 以上の分子量を持つ分子は通過することができないが、それより小さい分子は水と一緒にメンブランを通過する。濃縮工程の間、メンブランの頂部に水を加えないでの、その結果、容量が減少し、分子量 2,000,000 以上の分子の濃度が増大する。メンブランの頂部の容量が初期容量の 10% に減少されるまで限外通過を続ける。2 容量の発熱物質不含の蒸留水を加え、元の容量の 1/3 に減少されるまで限外通過を続ける。さらに 2 回操作を繰り返す。メンブランを通過した溶液を塩化ナトリウムで 0.1 M にし 4 容量の 9.5% エタノールにより沈殿させる。沈殿を 7.5% エタノールで 3 回洗浄した後、減圧乾燥する。

出発物質の 0.2% に相当する。

実験例4-1 ヒアルロン酸の架橋誘導体、および様々なアルコールによる部分的エスチル化誘導体のフィルムの調製

実験例 6～15、19～20 および 37 のようにして全成分を加えた後、ホモジナイズして得た DMSO 溶液をガラス皿に所望の厚みで重層し、窒素雰囲気下、完全な除湿条件下、遮光して 24 時間おく。

このようにして得られた架橋し、エスチル化されたヒアルロン酸誘導体のフィルムであって、テトラブチルアンモニウム・カルボキシ基が存在しているフィルムを、まず、1% NaCl、次いで蒸留水に対し、溶液を定期的に交換しながら 4°C で透析する。上記の架橋誘導体のナトリウム塩を含んだフィルムを次に、2 枚のセロファン膜の間に挟み、スラブドライヤー中、37°C で減圧乾燥する。

薬物製品および医薬剤

このようにして得られる生成物(ヒアラストン西分)の平均分子量は 50,000～100,000 である。

HY の収率は最初の出発物質である新鮮な組織について、0.4% に相当する。

実験例4-0 ヒアレクチン西分を得る方法

実験例 3-9 の如くにして分子篩脱限界 200,000 の限外過濾メンブランの頂部にある容器に採取した濃縮液を、グルクロロン酸の用量にに基づく定量分析測定によって 5 mg/mL ヒアルロン酸含有溶液が得られるまで水で希釈する。

溶液を塩化ナトリウムで 0.1 M にし、次いで、4 容量の 9.5% エタノールで沈殿させる。沈殿を 7.5% エタノールで 3 回洗浄した後、減圧乾燥する。

このようにして得られた生成物(ヒアレクチン西分)の分子量は 500,000～730,000 である。これは分子量測定値が約 2,500～3,500 糖単位の構成度の高い、特定のヒアルロン酸西分に対応する。HY の収率は元の新鮮な組織

本発明の新鮮な架橋誘導体およびその塩を活性物質とする医薬剤は、その架橋誘導体がさらには治療活性的なアルコールでエスチル化されており、さらに／または塩化されてもよく、HY そのものの特徴と同じ目的のもの、および、治療活性的なアルコールのエスチルの場合には、そのアルコールの特徴に相当する用途を意図しているもの、のいずれの場合であっても、通常の試形剤を含有し、筋肉、經直腸、非筋肉、皮下、局部、皮内、あるいは局部的に用いられる。従って、それらは丸剤、錠剤、ゼラチンカプセル剤、カプセル剤、座薬、軟ゼラチンカプセル剤等の固形または半固形の剤形をとる。非筋肉および皮下投与のために筋肉内または皮内投与のための剤形、あるいは注入、または静注に適した剤形を用いることができる。従って、本発明の活性物質を、溶液または凍結乾燥粉末として、活性化合物を薬学的に評価しうる／またはそれ以上の試形剤または希釈剤(生理的な液体に適合した浸透圧型を有する)とペールしておくと、上記の使用に便利である。局部

使用については、鼻スプレーのようなスプレー製剤をも考慮すべきであり、硬膏剤の局所使用のためのクリームまたは軟膏は、皮内投与用に適切に製造され得る。

本発明の製剤はヒトまたは動物への投与を目的とするものである。それらは、溶液、スプレー、軟膏およびクリームの場合には活性物質を0.01-1.0%、圆形剤の場合には1-10.0%、軟膏は5-50%含有している。投与すべき用量は、所望の効果および選択された投与経路に関する指示に従って変更しうる。そのような製剤の1日当たりの用量は、例えばヒトまたは馬に対する、関節炎の治療等の対応する治療におけるヒアルロン酸の使用、並びにその活性を利用すべき治療活性なアルコールの両者について、既知の対応する製剤における使用から推測しうる。従って、例えば、コーチゾンを併せたヒアルロン酸エステルの用量は、そのエステル中の含有量および既知の医薬品の中の通常の用量から導かれる。

化粧品製品においては、本発明の新規な架橋誘

ら導かれるものであるか、あるいは、特に、それに伴っている、そのような性質を有する物質のための試験として機能するものであつてよい。従つて、特に重要なのは、前記の薬剤において、薬学的に活性な成分を化粧品学的な因子で置き換えた、薬物模擬の化粧品組成物である。

香料工業において用いられているアルコールから導かれる上記エステルの使用は、発香成分の後後かつて完了した、遮断された放出を可能にするので、技術の重要な進歩である。

本発明の重要な応用の1つは既述の衛生および外科用製品、その製造および方法に係る。従つて本発明は、市場化されている、ヒアルロン酸含有製品と同様の製品であるが、遊離の酸またはその塩の代わりに本発明の架橋誘導体をも含有している製品、例えば保湿剤または眼科用レンズ等を包含する。

本発明の完全に新規な衛生および外科用製品は、シートまたは糸状に形成しうる適当な有機溶媒によってそのように再生し、外科用のフィルム、シ

導体およびその塩を、当該技術分野で通常用いらされている試験剤、例えば既に医薬品に関して列挙したもの、と混合する。特に、局所使用のためのクリーム、軟膏、ローションは、ブレグネノロンのようなステロイド、または上記の活性物質等の活性な化粧品用物質を付加して構成され得る。これらの製品中での本発明の新規な架橋誘導体は、既述の低級脂肪族アルコールのようないわば活性を有しないアルコールのエステルであることが望ましい。これらの製品においては、化粧品効果は、遊離のヒアルロン酸またはその塩の場合のように、多種類の本来の性質によっている。

しかしながら、化粧品製品はヒアルロン酸の作用とは異なる特異的な作用を有する物質、例えば、防腐剤、遮光剤、防水剤、または再生性物質、しわ防止剤または発香性物質に基づいていてもよい。この場合、本発明の新規な架橋誘導体はそれ自身が活性物質であって、それらの性質を有するアルコールから導かれたもの、例えば香水の場合、高級脂肪酸アルコールまたはテルペンアルコールか

ートおよび糸に形成し、火傷後の皮膚の剥離な損傷の場合における皮膚補助または代用品、あるいは外科的な縫合用の糸を得る。特に本発明はこれらの使用法およびこれらの製品の1つの製造方法であつて、(a)ヒアルロン酸またはその塩の1つを、ケトン、エステル、またはカルボン酸アミド、特に1-5個の炭素原子を有し、炭素原子数1-6個のアルキル基から導かれた脂肪族のジアルキルアミド、特に、有機スルホキシドから導かれるもの即ち、炭素原子数6個までのアルキル基を有するジアルキルスルホキシド、特にジチルスルホキシド、ジエチルスルホキシド、のような中性溶媒、更にまた第一に、低沸点のフッ化溶媒、特にヘキサフルオロイソブロノール等の適当な有機溶媒中溶液とし、(b) この溶液をシート又は糸状に形成し、(c) 第1の溶媒とは混ざり合うが、その中にヒアルロン酸エステルが溶けることのない別の有機または水性溶媒、特に、エチルアルコールのような低級脂肪族アルコール(混式溶媒、Wet spinning)と接触させることにより

有機溶媒を除く、または、ヒアルロン酸誘導体の溶液を調製するのに左程高くなき沸点の溶媒を用いたときにはこの溶媒をガス気流により、特に適当に過熱した空室の存在下で除虫する(乾式纺績法、Dry spinning)。

本発明新規な架橋誘導体から得られた糸は、傷または外科の医療用に用いるリントの製造に有用である。そのようなリントを用いると、それが含有している酵素の作用によって器官内で生物分解を受けるので極めて肝合である。これらの酵素はエステルを、ヒアルロン酸と対応するアルコールおよび既に器官内に存在している化合物、あるいは、アルコールのような無害な化合物とに分解する。従って、そのようなリント、および上記の糸は、酵解作用によって、徐々に吸収されるので、それを術後も生体内に残しておくことができる。

上記の衛生および外科用製品の製造において、機械的特性を促進する(糸の場合には、絡まりにたいする抵抗を増強する)ために可塑剤を加える

ある。

更に本発明の新規な架橋誘導体の医療および外科の分野での応用例は、プレート、ディスクおよびシート等の様々な圓形挿入体の製造にあり、これらは今日用いられている合成プラスチック材料を含んだ金屬製のもの(この場合、ある期間の経過後、圓錐の挿入体を除去することを意図して用いる)の代わりとなる。動物のコラーゲンを含有する製剤はそれがタンパク性であるために炎症や拒絶反応のような不快な反応を引き起こす。本発明の新規な架橋誘導体の場合、ヒトヒアルロン酸でなく、動物起源であっても、種々の動物種で多種類に関しては不適合が存在しないので、このような危険性は生じない。

もう一つの用途は軟組織の損傷の修正および増加である。除去された、または損傷された軟組織の代替となる、安全かつ有効な生物材料の必要性が時折感じられていた。パラフィン、テフロンペースト、シリコンおよびウシコラーゲン等の多くの同種移植形成用材料が、失われた軟組織の代

と肝合である。これらの可塑剤の例えば、脂肪酸のアルカリ塩、例えば、ステアリン酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、多数の炭素原子を有する有機酸のエステル等である。

本発明の新規な架橋誘導体の生物分解性を生物内に存在しているエステラーゼを介して利用する他の応用例は、医薬の皮下埋込み用のカプセルの製造、または皮下または筋肉内注射等のためのマイクロカプセルの製造である。皮下薬物を徐々に放出し、「遅延」作用をもつて適用するために、今日までシリコン材料のカプセルが用いられてきたが、そのようなカプセルは器官内を移動しやすく、回収が不可能であるという不利益を有している。本発明の新規な架橋誘導体に、このようなおそれのないことは明らかである。又、木発明の新規な架橋誘導体を含有するマイクロカプセルは今日までその使用を極めて制限されていて、その使用に伴う問題点を認識しているという点で重要である。この製剤は、注射による「遅延」効果が得られる、という適用の全く新しい境地を拓くもので

わりに用いられていた。しかしながら、これらの材料は、その場所で動き、血の反応を伴い、皮膚組織に留まらない、永久的な変化をもたらす。従って、医療分野で多方面に用いられる生物材料への希望は根強い。本発明の新規な架橋誘導体は、丘疹、術後の萎縮性異常、モー(Mohs)の化学的外科、口唇の裂傷、加令によるしわ等の損傷を修正するために用いて安全かつ有効である。

本発明の新規な架橋誘導体の医療および外科分野への適用には、様々な性質の傷または病瘍の医療のための強硬性材料からなる製剤、特にスポンジ状の製剤が含まれる。

以下に製剤例を挙げ、本発明の代表的な製剤を示す。

製剤例】 コーチゾンを含有するコリリウム
(Collirius)

成 分 1.0 g

ヒアルロン酸のコーチゾンおよ 0.300 g
びオクタジオールとの部分
のかつ混合エステル

(実施例37A)

p-オキシ安息香酸エチル	0. 010g	ソルビトール	70	1. 500
p-オキシ安息香酸メチル	0. 050g	テストクリーム		0. 050
塩化ナトリウム	0. 900g	注射製剤用の水/g. b. a.		100. 00

注射製剤用の水/g. b. a. 100. 00ml

製剤例2 ヒアルロン酸と1,3-プロパンジ

オールとの部分エステルを含有する
クリーム

成 分 g/100g

ヒアルロン酸と1,3-プロパンジ 0. 2

シジョールとの部分エステル

(実施例31)

モノステアリン酸ポリエチレ	10. 000
セチコール	400
セチコール V	5. 000
ラネッテ SX	2. 000
バラオキシ安息香酸メチル	0. 075
バラオキシ安息香酸プロピル	0. 050
ジヒドロ酢酸ナトリウム	0. 100
グリセリン P. U	1. 500

特許出願人 フィディーア・ソシエタ・ペル・

アチオニ

代理 人 弁護士 青山 葦(外1名)